

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591374

研究課題名(和文) ストレスによる食餌嗜好性の変化と脳内メカニズムの解明

研究課題名(英文) The central regulatory mechanism for stress induced food selection

研究代表者

岡本 士毅 (OKAMOTO, SHIKI)

生理学研究所・発達生理学研究室・助教

研究者番号：40342919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスを用いた社会的心理ストレス実験後に、炭水化物食嗜好性が高まる事を見出した。ストレス応答性ホルモンであるコルチコトロピン放出ホルモン(CRH)放出ニューロン特異的にAMPキナーゼに対するshRNAを発現させると、ストレス負荷後にグルココルチコイド分泌は促されたが、食餌嗜好性が変化しなかった。この結果から、視床下部室傍核の一部のCRHニューロンにおけるAMPキナーゼ活性化がストレス負荷後の食餌嗜好性変化に重要であり、グルココルチコイド分泌制御系と乖離する事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Paraventricular hypothalamus (PVH) is implicated in the selection of high carbohydrate diet (HCD) and high fat diet (HFD). I clarified that AMP-activated protein kinase (AMPK) in corticotropin releasing hormone, CRH neurons of PVH are critical for food selection whether HCD or HFD. CRH is well-known as stress responsible hormone. Social defeat stress also induced carbohydrate selection rather than fat intake. Inhibition of CRH expression using shRNA technique could completely disappear this preference change. Also the CRH neuron-specific inhibition of AMPK mRNA expression or neuronal activity, using DREADD system, significantly abolished stress induced food preference change. These results reveal a novel role of AMPK in CRH neurons of PVH in food selection behaviour under stress conditions.

研究分野：神経生理学

キーワード：CRH AMPK

1. 研究開始当初の背景

AMP キナーゼ(AMPK)は、酵母から植物、哺乳動物に至る、ほとんどすべての細胞に発現するセリン・スレオニンキナーゼであり、細胞内エネルギーレベルの低下によって活性化し、ATP レベルを回復させる酵素として知られている。AMPK は、レプチン・アディポネクチン・レジスチン等の代謝調節ホルモン、並びに運動によって活性が変化し、骨格筋、肝臓、白色脂肪細胞などにおいて糖・脂質代謝に調節作用を営む。また視床下部の AMPK 活性が摂食行動の調節に関与する事を、研究代表者の所属部門教授・箕越は、アデノウィルスを用いて変異 AMPK を内側視床下部に発現させることにより、体重・摂食量が変化することを示している (Nature 2004)。

これまでに研究代表者は、摂食行動と代謝調節への視床下部 AMPK の関与をより長期間で解明するため、レンチウイルスベクターに持続活性化型変異 AMPK (CA-AMPK)を組み込み、視床下部に慢性的かつ選択的に発現させ観察した。すると対照群に比べ有為に摂食量が増加し、体重が大幅に上昇する事を見いだした。更に興味深い事に、高脂肪食よりも高炭水化物食(蔗糖含有)を多く摂食していた。そこで CA-AMPK マウスの嗜好性を調べるため、同じケージ内で2種類の餌を同時に選択し摂食できる行動計測ケージを独自に考案・作成し、高脂肪食と高蔗糖食を自由に選択させた時の各々の摂食量を測定した。すると、対照マウスは高脂肪食を主として摂取するのに対し、CA-AMPK マウスは高蔗糖食を多く摂取した。

更に AMPK による嗜好性制御作用がどのような生理的条件下で機能しているかを明らかにする目的で、視床下部 AMPK 活性が亢進する絶食後の再摂食時における嗜好性変化を調べた。絶食により室傍核 (PVH) AMPK 活

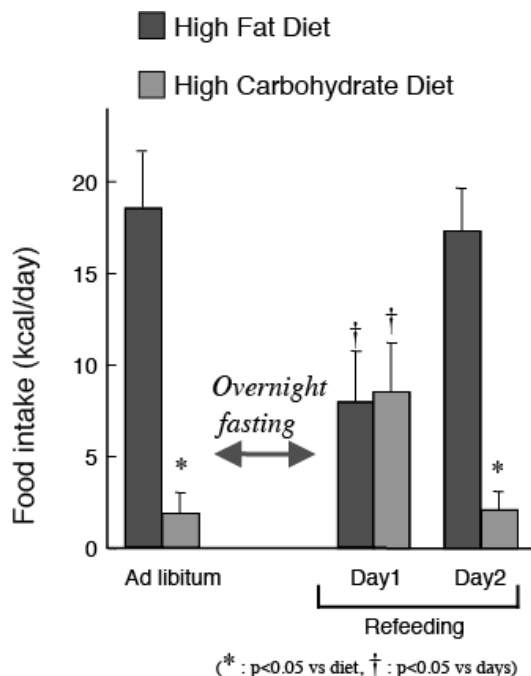
性は亢進することが、再摂食させたマウスは、CA-AMPK マウスと同様に高蔗糖食の摂食量が有意に増加した。

また PVH-AMPK 活性は、視床下部における脂肪酸酸化を促し、嗜好性を制御している事も明らかにした。絶食による全身性エネルギー減少を速やかに回復させるため、高脂肪食より高炭水化物食からの ATP 合成を促す制御機構を担うと考えられる。しかも肥満動物の視床下部では絶食負荷時においても AMPK 活性は上昇せず、高脂肪食の摂食量が更に増加した。室傍核 AMPK 活性は、全身のエネルギー状態に応じて、最適な栄養素の摂取制御機構として、非常に重要なメカニズムと考えられるが、肥満状態における活性化の鈍化は、肥満を更に助長するメカニズムをも担っている可能性が高い。

このような食餌嗜好性制御を担う視床下部ニューロンを探索するため、PVH に発現する各種ニューロペプチドを脳内に投与し、嗜好性変化を測定した所、ストレス応答性ホルモンとされるコルチコトロピン放出ホルモン(CRH)投与でのみ、炭水化物嗜好性を増強させた。そこで CRH-Cre マウスを用いて、CRH ニューロン特異的に CA-AMPK を発現させると、炭水化物嗜好性の亢進を観察した。この結果は、AMPK 反応性 CRH ニューロンが食餌嗜好性制御における主要制御因子である事を示しており、現在論文投稿中である。食餌嗜好性調整を担う CRH が、ストレス時に上昇する視床下部ホルモンで有る事を考え合わせると、ストレス負荷時に食餌嗜好性が変化するのか、もし変化するならば、ストレス負荷時にも CRH ニューロンが担う食餌嗜好性制御ニューロンが寄与するのか、を詳細に研究するに至った。

2. 研究の目的

AMPK は、近年、肥満・糖尿病の分野でとりわけ注目されるキナーゼである。研究代表者は持続活性化型 AMPK ミュータントを、レンチウイルスベクターを用いてマウス視床下部 PVH に限局して発現させると、高脂肪食よりも高炭水化物食を好む事を発見し、その制御機構として、PVH における脂肪酸酸化が関与する事を明らかにした。さらに PVH の一部の CRH ニューロンが AMPK の活性化によって神経活動を上昇させ、嗜好性制御を担う事を見出した。CRH は古くからストレス応答性ホルモンとして知られる。そこで本研究では、社会的心理的ストレス負荷時における食餌嗜好性の変化と、その制御機構の発動機序、CRH ニューロンにおける AMPK と脂肪酸酸化の関与を調べることにより、ストレスが摂食障害を引き起こす脳内機構の一端を明らかにする事を目的とする。



3. 研究の方法

CRH-Cre ノックイン(KI)マウスに、社会的心理的ストレスを負荷し、高脂肪食と高炭水化物食に対する食餌嗜好性の変化、及び PVH における AMPK-脂肪酸酸化活性の変化を調べる。社会的心理ストレスとして、攻撃性の高い同性異系統マウスと短時間接触させ、闘争・敗北させる、または母子分離などを試み、嗜好性の変化を引き起こす最適なストレス条件を決定する。本課題で注目する CRH は、古くからストレス性摂食抑制を引き起こすターゲット分子とされるが、これまでに見出した食餌嗜好性変化は総摂取カロリーでは摂食抑制効果を伴わないので、摂食抑制が認められずに嗜好性のみ変化する条件検討を進める。さらに AMPK や脂肪酸酸化関連遺伝子に対する shRNA、活性型 AMPK を組み込んだ LoxP 配列を持つレンチウイルスベクターを作成し、CRH-Cre KI マウスの PVH に選択的に感染させ、ストレス負荷時の食物嗜好性に及ぼす影響を調べる。

また内因性アセチルコリンに結合せず、人工アゴニストのみに結合する変異型ムスカリン受容体を CRH ニューロンのみに発現させる (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs)DREADD 法を用いて、CRH ニューロン活性のみをストレス前後で活性化(hM3Dq)または抑制(hM4Di)し、CRH ニューロン活性化のストレス負荷時における寄与を明確にする。

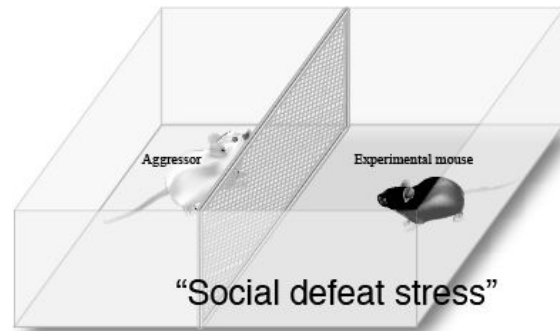
さらに、ストレス負荷を与えたマウス及び、レンチウイルスを用いて遺伝子改変したマウスのPVHからCRHニューロンを単離・同定し、細胞内Ca²⁺代謝を調べ、その活性化機構を探ることにより、AMPK-脂肪酸酸化がどのようにして細胞内Ca²⁺代謝を調節するのか、またストレスによってどのような異常を来すのかを明らかにする。

4. 研究成果

本研究では、社会的心理的ストレス負荷によって、総摂食量に影響を与えず、絶食時に見られた炭水化物摂取量が増大する嗜好性変化のみを誘導するストレス条件を確立する事が出来た。過度の身体的浸襲ストレスが視床下部 CRH を活性化し、副腎からのグルココルチコイド分泌を促す事は、古くから研究されており、ショック状態に対する防衛機構を担っていると考えられる。しかし身体的浸襲ストレスは、様々なストレス応答を示すと同時に、激しい摂食抑制を伴い、食餌嗜好性機構の検討には不向きであると考えられた。また幼少期のストレス負荷により、長期間に渡り異常行動を生じる事が数多く報告され

ている母子分離ストレスは、総摂取カロリーを上昇させるまたは逆に減少させる報告もある。

そこで攻撃性の高いマウスと比較的短時間接触させる心理的敗北ストレスを選択した。しかし常に安定したストレス負荷が不可欠であるので、まず直接接触後、ケージ内を仕切れるように加工したストレスケージを考案し、一定時間以上の過度ストレスを防ぎつつ、安定したストレス条件をもたらず試作ケージ開発を行い、条件検討を進めた。



予め攻撃性の高い同性異系統マウス(アグレッサー)をストレスケージで数日間飼育し、アグレッサーが自分の縄張りや巣を作成する事を確認する。その後 CRH-Cre KI マウス(リプレッサー)を5分間、アグレッサーのケージに入れ、アグレッサーがリプレッサーを数回以上攻撃する事を確認する。5分後にストレスケージの上蓋を、中央に金網仕切りがある上蓋に交換し、同じケージ内でも直接接触できない状態で24時間同居させる。中央の金属性金網仕切りは、直接接触こそ出来ないが、視覚、聴覚、嗅覚は遮れないが、ストレス負荷中の餌と飲料水は、各々が独立して摂取可能になるよう設計し、ストレス負荷時に絶食・絶水に陥らないように工夫した。なおストレス負荷時に絶食に陥ったレプレッサーはいなかった。

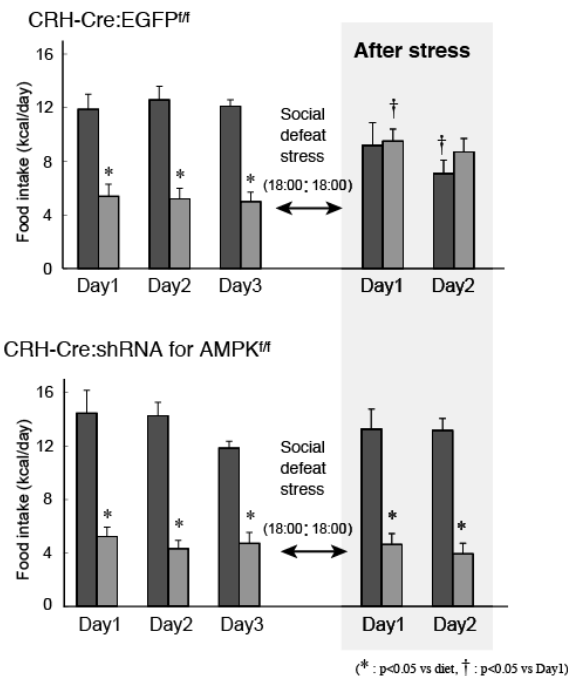
上記の条件でアグレッサーと短時間接触させ、闘争・敗北させることで、総摂食量に影響しない嗜好性変化条件の確立に成功した。さらに、過度の身体的浸襲ストレスと異なり、これまでの様々な心理ストレス実験で用いられる条件は、最低でも数回はストレス負荷を繰り返す必要があった。しかし社会的心理的ストレス負荷による嗜好性変化は、わずか1回のストレス負荷実験で明らかに炭水化物嗜好性への変化が見受けられ、総摂取カロリーに差異は見られなかった。さらに興味深い事に、絶食後の嗜好性変化は、再摂食当日しか維持されず、2日目には自由摂食時に見られる高脂肪食主体の食餌嗜好性に速やかに回復するのに比べ、心理的ストレスで生じる変化は、最低2日間は継続的に観察された。血中グルココルチコイド濃度は、既報通りストレス負荷により上昇するが、ス

トレス前と有為差は見られなかった。

そこで絶食後に生じる食餌嗜好性変化の制御ニューロンである CRH ニューロンの寄与を検討する為、CRH に対する shRNA をマウス PVH に限局発現させた後に、ストレス負荷を行った。するとストレス負荷で生じる炭水化物嗜好性への変化は全く観察されなかった。

次に、ストレス負荷時における AMPK 活性化状態を検討した所、ストレス負荷後に AMPK の活性化指標であるリン酸型 AMPK 量の上昇を観察した。

さらに CRH-CreKI マウスを用いて、CRH ニューロン特異的に AMPK mRNA 発現を抑制し、ストレス負荷を行った。するとグルココルチコイド分泌にはストレス負荷後も全く差は見られなかった。この事は、ストレス応答性グルココルチコイド分泌には、CRH ニューロンにおける AMPK は寄与しない事を示唆する。しかしストレス負荷による炭水化物嗜好性への変化は完全に遮断された。つまり CRH ニューロンに存在する AMPK は、社会的心理的ストレス負荷時においても、CRH 分泌を促し、下垂体-副腎皮質経路に影響なく、炭水化物嗜好性を促進する事が明らかになった。



さらに DREADD-hM4Di 法を用いて、CRH-Cre KI マウスの CRH ニューロン特異的に Gi 結合型変異ムスカリン受容体を発現させ、神経活動を抑制してストレス応答を検討した。CRH ニューロン特異的 AMPK mRNA 抑制マウスとは異なり、ストレス負荷後のグルココルチコイド濃度は低下するが、食餌嗜好性変化は完全に遮断された。

以上の事から、視床下部 PVH-CRH ニューロンの内、一部の AMPK 反応性 CRH ニューロンが、ストレス応答性食餌嗜好性制御ニューロ

ンであり、グルココルチコイド分泌への寄与は低いと考えられた。心理的敗北ストレス負荷時には、AMPK 活性化に伴い、CRH ニューロンの活性化を促し、総摂食量の低下を伴わずに炭水化物嗜好性のみを増強すると考えられた。更にストレス応答時に、何故炭水化物嗜好性が亢進するのかという生理的意義に関して継続的に実験を進める予定である。また CRH ニューロン内における AMPK を介した神経活動の活性化メカニズムについても現在継続して検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 6 件)

AMPK in the paraventricular hypothalamic nucleus regulates food selection behavior in mice

岡本土毅 (第 92 回日本生理学会、2015 年 3 月 23 日、神戸国際会議場、兵庫県神戸市)

視床下部室傍核 AMPK による食物選択行動の調節機構

岡本土毅 (第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会、2015 年 2 月 14 日、京都大学紫蘭会館、京都府京都市)

AMPK による食物嗜好性の調節機構

岡本土毅 (第 35 回日本肥満学会日韓合同シンポジウム、2014 年 10 月 25 日、シーガイアコンベンションセンター、宮崎県宮崎市)

AMPK による食物嗜好性の調節機構

岡本土毅 (第 91 回日本生理学会、2014 年 3 月 17 日、鹿児島大学、鹿児島県鹿児島市)

AMPK による食物嗜好性の調節機構

岡本土毅 (第 34 回日本肥満学会、2013 年 10 月 11 日、東京国際フォーラム、東京都有楽町)

AMPK in the paraventricular hypothalamus regulates food selection behavior in mice

Shiki OKAMOTO (The 36th Naito

conference、2013年9月12日、シャトレーゼ ガトーキングダムサッポロ、北海道札幌市)

〔図書〕(計 1件)

内分泌・糖尿病・代謝内科 2015 (科学評論社) p4、岡本土毅

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/endoclin/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 土毅 (OKAMOTO, SHIKI)

生理学研究所・発達生理学研究室・助教
研究者番号: 40342919

(2) 研究分担者

(0)

(3) 連携研究者

(0)